บทที่ 3
การทดลอง

3.1 สารเคมีและวัสดุ

3.1.1 สารเคมี

1. Acetone (Lab Scan, Ireland)
2. Calcium Chloride (Merck, Germany)
3. Di Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate (Merck, Germany)
4. Dibutyl Sebacate (Sigma – Aldrich, Germany)
5. Eudragit® L 100, Eudragit® S 100 (Rohm Gmbh, Germany)
6. Hydrochloric acid, 0.1 N (Lab – Scan, Ireland)
7. Iodine crystal (Merck, Germany)
8. Isopropanol (Lab Scan, Ireland)
9. Magnesium Stearate (Lab Scan, Ireland)
10. Monobasis Sodium Phosphate (Carlo Erba Reagenti, Germany)
11. Polyvinyl pyrrolidone (PVP K–90) (Shanghai Well Tone, China)
12. Pectin ชนิด high ester AMD 382 (Danisco, Denmark)
13. Pectin ชนิด low ester LC – 710 (Danisco, Denmark)
14. Polyethylene Glycol, PEG – 6000 (Merck, Germany)
15. Potassium Iodine (Carlo Eaba, Germany)
16. Talcum (Sigma – Aldrich, Germany)
17. Titanium dioxide (Lab Scan, Ireland)

3.1.2 สายพันธุ์แบคทีเรีย

สายพันธ์แบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส; *L. acidophilus, L. amylovorus, L. brevis* subsp. brevis, *L. bulgaricus, L. casei, L. cellobiosus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. delbrueckii* subsp. *Lactis, L. fermentum, L. halotolerans, L. jensenii, L. lactis, L. plantarum, L. sake* and *L. salivarius* subsp. *salivarius* (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

3.1.3 Culture medium

1. Agar (Difco, USA)
2. Beef extract (Difco, USA)
3. Glucose (Mreck, Germany)
4. K_2HPO_4 (Merck, Germany)
5. Man Rogasa and Sharp (MRS) (Merck , Germany)
6. $MgSO_4 . 7 H_2O$ (Merck, Germany)
7. $MnSO_4 . H_2O$ (Merck, Germany)
8. Peptone (Difco, USA)
9. Sodium acetate (Merck, Germany)
10. Sorbitan monooleate (Merck, Germany)
11. Tri-ammonium citrate (Merck, Germany)
12. Yeast extract (Difco, USA)

3.1.4 แป้ง

แป้งข้าวเหนียว (บริษัท ชอเฮงจำกัด ประเทศไทย)

แป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่ง (Fluka, Switzerland)

และแป้งถั่วเขียว (บริษัทสิทธินันท์จำกัด ประเทศไทย)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น BX 60, Japan)
2. ชุดเลนส์โพลาไรซ์มาตรฐาน (Olympus รุ่น BX 60, Japan)
3. เครื่องลดขนาด Oscillating granulator (KSL รุ่น 380 V3PH, ประเทศไทย)
4. ตู้อบ (Binder รุ่น ED 240/E2 , Germany)
5. เครื่องเขย่าชุดแร่ง (Retsch รุ่น AS 200, Germany)
6. ชุดแร่งขนาด 20, 30, 40 mesh (Retsch รุ่น AS 200 , Germany)
7. ชุดตุ้มน้ำหนัก (CHAOS ขนาด 5, 10, 20, 30, 50, 100 และ 200 กรัม)
8. Hot plate และ magnetic stirrer (Heldolph รุ่น MR – 2002, Germany)
9. เครื่อง Glatt (Glatt BRD, Germany Germany)
10. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Model Jeol JSM-5910, Japan)
11. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (SONY รุ่น DSC – S750, China)
12. เครื่องวัดความกร่อน (Pharma Test, Germany)

13. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Sartorius, Model 1702, Germany)

3.3. วิธีการทดลอง

3.3.1 ศึกษาชนิดของแป้งดิบที่สามารถถูกย่อยโดยแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส

3.3.1.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของแกรนูลแป้ง

นำแป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และแป้งถั่วเขียว ไปส่องดูลักษณะโครงสร้างของเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาและแบบใช้แสงโพลาไรซ์แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล ต่อจากนั้นนำแป้งดังกล่าวข้างต้นมาเป็นส่วนประกอบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นโดยใช้แป้งแทนกลูโคสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (starch agar) และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไปเลี้ยงแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส หลังจากเตรียมเสร็จจะนำแผ่นวุ้นจำนวนหนึ่งที่มีเม็ดแป้งผสมอยู่ไปบดให้พอละเอียดแล้ววางบนแผ่นสไลด์ และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการเดียวกับการใช้ส่องดูแป้งดิบ เพื่อตรวจสอบดูว่าแป้งที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นที่อุณหภูมิ 47±2 °ซ ที่มีแป้งในปริมาณ 2% (w/v) จะมีโครงสร้างของเม็ดแป้งเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือไม่

3.3.1.2 ศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคโต-บาซิลลัสบนอาหารดัดแปรแป้งและความสามารถในการย่อยแป้ง

นำแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสจำนวน 15 ชนิดที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์มา เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นที่ใช้แป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3 – 5 วัน ให้สังเกตว่ามีเชื้อชนิดใดบ้างที่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยสังเกตดูจากความหนาของโคโลนี เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยประเมินความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นดังนี้

\- = ไม่มีการเจริญ

\+ = เจริญได้น้อย

\++ = เจริญได้ปานกลาง

\+++ = เจริญได้ดี

\++++ = เจริญได้ดีและเกิดวงใสรอบโคโลนี

จากนั้นทำการทดสอบการย่อยแป้งด้วยการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการย่อยแป้งเกิดขึ้น วงใสรอบ ๆ โคโลนีจะไม่เปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงิน (Michael และ Pelezar, 1995)

3.3.2 ศึกษาลักษณะโครงสร้างของแป้งที่ผ่านประเมินความเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

3.3.2.1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะเม็ดแป้ง โดยโปรยผงแป้งจำนวนเล็กน้อยลงบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนแป้งแล้วเกลี่ยให้กระจาย ปิดด้วย cover glass แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาและแบบใช้แสงโพลาไรซ์ บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูปดิจิตอล

3.3.2.2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาดและผิวส่วนนอกของเม็ดแป้ง โดยโปรยผงแป้งจำนวนเล็กน้อยลงบน stub แล้วเคลือบด้วยทอง แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope : SEM)

3.3.3 การเตรียมแกรนูลจากแป้งที่ผ่านประเมินความเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

เตรียมสารยึดเกาะ (binder) ในปริมาณความเข้มข้น 10% W/W โดยชั่ง polyvinyl pyrrolidone (PVP K-90) 10 กรัม โปรยในน้ำกลั่นประมาณ 70 กรัม วางบน hot plate ที่อุณหภูมิ 50 °ซ และคนตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer จนได้เป็นสารละลายใส ปล่อยให้สารละลายเย็นตัวลงและปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้น้ำหนัก 100 กรัม นำสารละลาย 10% PVP ที่เตรียมได้ค่อย ๆ เทลงไปผสมในแป้งข้าวเหนียว 100 กรัมในโกร่งขนาดใหญ่ ใช้ลูกโกร่งบดผสมจนได้ก้อนเปียก (wet mass) ที่เปียกพอเหมาะและสามารถยึดเกาะกันเป็นก้อนได้ดี นำ wet mass ที่ได้ไปผ่านแร่งเบอร์ 16 แล้วนำแกรนูลเปียกที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแกรนูลแห้งที่ได้ไปลดขนาดด้วยการผ่านแร่งเบอร์ 20 โดยใช้เครื่อง oscillating granulator นำแกรนูลที่ได้ไปคัดขนาดอีกครั้งโดยคัดเอาเฉพาะแกรนูลที่ค้างอยู่บนแร่งขนาด 20 mesh เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป สุ่มตัวอย่างแกรนูลที่ได้ส่วนหนึ่งเพื่อนำไปประเมินคุณภาพและลักษณะของแกรนูล ส่วนแกรนูลที่เหลือทั้งหมดเก็บไว้เพื่อนำไปเคลือบในขั้นตอนต่อไป

3.3.4 ประเมินคุณภาพและลักษณะของแกรนูล

3.3.4.1 ลักษณะภายนอกของแกรนูล

ตรวจลักษณะโดยทั่วไปของแกรนูลที่เตรียมได้ทั้งก่อนและหลังการลดขนาดด้วยเครื่อง Oscillating granulator รวมทั้งที่ผ่านการคัดขนาดด้วยแร่งเบอร์ 20

3.3.4.2 ลักษณะของแกรนูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำแกรนูลที่คัดขนาดด้วยแร่งเบอร์ 20 ไปบดให้เป็นผงละเอียด และนำไปส่องดูลักษณะของเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

3.3.4.3 ความแข็งของแกรนูล

นำแกรนูลที่ผ่านการคัดขนาดด้วยแร่งเบอร์ 20 มาวัดความแข็งโดยใช้ตุ้มน้ำหนักที่มีขนาด 2, 10, 20, 50, 100 และ 200 กรัม โดยเริ่มต้นจากการใช้ตุ้มน้ำหนัก 2 กรัมวางบนแกรนูล หากแกรนูลไม่แตกให้เปลี่ยนตุ้มน้ำหนักที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นวางทับบนแกรนูลเดิมอีกครั้ง กระทำเช่นนี้จนกว่าเม็ดแกรนูลจะแตกแล้วบันทึกค่าตุ้มน้ำหนักที่มีผลทำให้แกรนูลแตกออกเป็นค่าความแข็งของแกรนูลเม็ดนั้น การทดลองครั้งนี้จะวัดความแข็งของแกรนูลจำนวน 50 เม็ด เพื่อนำไปหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแข็งของแกรนูล

3.3.4.4 ความกร่อนของแกรนูล

สุ่มตัวอย่างแกรนูล 50 เม็ด แล้วบันทึกน้ำหนักเริ่มต้นไว้ นำแกรนูลทั้งหมดเข้าไปในเครื่องวัดความกร่อน (Friabilator) แล้วตั้งเครื่องให้หมุนรวม 240 รอบ เมื่อครบแล้วให้นำเม็ดแกรนูลทั้งหมดออกมาไปผ่านแร่งขนาด 20 mesh อีกครั้ง แล้วจึงนำแกรนูลทั้งหมดไปชั่งหาน้ำหนักแกรนูลที่เหลือ บันทึกน้ำหนักสุดท้ายไว้ เพื่อคำนวณหาค่าความกร่อนของแกรนูลหลังจากทดสอบ โดยเทียบค่าจากสูตรคำนวณหาความกร่อนของแกรนูลดังนี้

$$\text{ความกร่อนของแกรนูล} = \frac{(\text{น้ำหนักแกรนูลเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักแกรนูลสุดท้าย})}{\text{น้ำหนักแกรนูลเริ่มต้น}} \times 100$$

แกรนูลจะผ่านการประเมินเมื่อมีความกร่อนไม่เกิน 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยอิงจากค่าการทดสอบของเม็ดยา (BP 1993)

3.3.5 การเคลือบแกรนูลแป้ง

3.3.5.1 การเคลือบด้วยฟิล์มพอลิเมอร์สังเคราะห์

1. การเตรียมน้ำยาเคลือบฟิล์ม (Film coating solution)

แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1.1 Coating solution ประกอบด้วย

Eudragit®	25	กรัม
Dibutylsebacate	2.5	กรัม
Isopropanol	381.5	กรัม
Acetone	161.5	กรัม
รวม	570.5	กรัม

1.2 Pigment suspension ประกอบด้วย

Talcum	35	กรัม
Magnesium stearate	5	กรัม
Titanium dioxide	15	กรัม
Colouring agent	0.5	กรัม
PEG 6000	5	กรัม
Distilled water	10	กรัม
Isopropanol	179.5	กรัม
รวม	250.0	กรัม

การเตรียมน้ำยา Pigment suspension

ละลาย PEG 6000 ในน้ำกลั่นจนได้สารละลายใส หลังจากนั้นนำส่วนประกอบที่เหลือทั้งหมดในส่วนของ pigment suspension ไปผสมกับตัวทำละลาย (Isopropanol) แล้วปั่นทั้งสองส่วนให้เข้ากันจนเป็นสารละลายเนื้อเดียว

การเตรียมน้ำยาส่วนที่ 2 (Coating solution)

นำ Isopropanol และ Acetone ผสมเข้าด้วยกันแล้วค่อย ๆ โปรย Eudragit® (L100: S 100) ในอัตราส่วน 1:1 ลงไปในตัวทำละลายทั้งสองพร้อมทั้งปั่นตลอดเวลาจนได้สารละลายใสหลังจากนั้นให้เติม dibutylsebacate ลงไปผสมให้เข้ากัน

ผสมน้ำยาทั้งสองส่วนโดยเทน้ำยาส่วนที่เป็น pigment suspension ลงใน coating solution และปั่นต่อไปเพื่อผสมให้สารละลายทั้งสองเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การเคลือบฟิล์มแกรนูล

ในการเคลือบแต่ละครั้งจะใช้น้ำหนักของแกรนูลที่ผ่านการคัดขนาดทั้งหมด 250 กรัม โดยสภาวะที่ใช้ในการเคลือบแกรนูลโดยใช้เครื่อง Glatt® เป็นดังนี้

อุณหภูมิของอากาศขาเข้า	50-55 °ซ
อุณหภูมิของอากาศขาออก	35-40 °ซ
ความเร็วของเครื่องรีดน้ำยา	3-4 รอบต่อนาที
อัตราการพ่นด้วยน้ำยา	7.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดันอากาศที่ใช้ฉีดพ่น	2.0 บาร์

ในขั้นตอนการเคลือบจะนำแกรนูลแป้งที่เตรียมไว้ 250 กรัม ใส่ลงในส่วนของเครื่องเคลือบที่เป็นภาชนะสำหรับบรรจุแกรนูลที่จะทำการเคลือบ ทำการอุ่นแกรนูลในสภาวะที่ตั้งไว้สำหรับการเคลือบนานประมาณ 5 นาที แล้วจึงพ่นน้ำยาเคลือบฟิลม์ตามสภาวะที่กำหนด หลังจากนั้นให้ทำการสุ่มตัวอย่างแกรนูลเมื่อเคลือบน้ำยาไปแล้วทุก ๆ 200 มิลลิลิตร เพื่อตรวจดูน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของแกรนูลที่ถูกเคลือบ นำแกรนูลที่ผ่านการเคลือบและมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 25, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับจากน้ำหนักเริ่มต้น ตัวอย่างแกรนูลเคลือบที่ได้ตามน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นให้เก็บไว้ใน dessicator เพื่อป้องกันความชื้นและรอทำการทดสอบในขั้นตอนของการทนต่อน้ำย่อยต่อไป

3. การตรวจลักษณะทางกายภาพของแกรนูลเคลือบ

ทำการตรวจสอบลักษณะภายผิวภายนอกของแกรนูลที่ผ่านการเคลือบด้วยฟิล์มของพอลิเมอร์สังเคราะห์ Eudragit® L100-S100 (1:1) ที่มีความหนาของฟิล์มต่างๆ กัน โดยใช้กล้องดิจิตอลและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4. การทดสอบการรั่วออกของแป้งจากแกรนูลเคลือบ

นำแกรนูลที่เคลือบด้วย Eudragit® L100 : S100 (1:1) ที่มีเปอร์เซ็นต์ความหนาในการเคลือบจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 25, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ไปทดสอบความทนต่อสภาพของน้ำย่อยเสมือนของระบบทางเดินอาหาร โดยใช้สภาวะกรด-เบสที่อ้างอิงจาก Mura และคณะ (2003) และตรวจสอบแป้งที่รั่วออกโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Das และ Ng (2010)

3.3.5.2 การเคลือบโดยวิธี ionotropic gelation technique

วิธีการเคลือบแกรนูลแป้งด้วยเพคตินในการทดสอบครั้งนี้ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sriamornsak และ Nunthanid (1998) โดยใช้เพคตินชนิด LC-710 ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 5, 6, 7, 8 และ 9% (w/w) โดยใช้วิธีการปั่นด้วยความเร็วสูงจนเพคตินละลายและเปลี่ยนเป็นเจล หลังจากนั้นชั่งแกรนูลแป้งในปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงไปในสารละลายเพคตินที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 – 9 % ดังกล่าว นำสารละลายเพคตินที่มีแป้งผสมอยู่และมีความหนืดที่แตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเพคตินใส่ในกระบอกฉีดยาและฉีดน้ำยาลงไปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 5%, 6%, 7%, 8% และ 9% (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นสารละลายตลอดเวลาที่ทำการหยดสารละลายลงไปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์นานเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นให้แยกแกรนูลที่เคลือบได้ออกจากสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปทดสอบดังต่อไปนี้

1. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของแกรนูลที่เคลือบด้วยเพคติน

ตรวจลักษณะทางกายภาพภายนอกของแกรนูลที่เคลือบด้วยกล้องดิจิตอล บันทึกน้ำหนักแกรนูลทั้งน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นนำแกรนูลที่เคลือบได้ไปศึกษาลักษณะผิวอนุภาคภายนอกและขนาดรูปร่างตลอดจนลักษณะภาคตัดขวางด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. การทดสอบการรั่วออกของแป้ง

นำแกรนูลแป้งที่เคลือบด้วยเพคตินที่ได้จากการเคลือบด้วยสารละลายของเพคตินในความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5-9% (w/w) ไปทดสอบความทนต่อน้ำย่อยเสมือนของระบบทางเดินอาหาร โดยใช้วิธีการทดลองของ Mura และคณะ (2003) และในส่วนการศึกษาการปล่อยออกมาของแป้งใช้วิธีการทดสอบที่ดัดแปรมาจากวิธีการของ Das และ Ng (2010)

ในการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลอง 3 ซ้ำและนำค่าที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยรายละเอียดของการทดลองความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะกรด-เบสของน้ำยาที่มีสภาพเสมือนระบบทางเดินอาหารเป็นดังนี้คือ นำตัวอย่างแกรนูลแห้งจำนวน 100 แกรนูล ใส่ลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดแน่นและมี 0.1 N. HCl pH 1.2 จำนวน 30 ml ที่มีสภาพเหมือนน้ำย่อยที่กระเพาะอาหารบรรจุอยู่ โดยแช่อยู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37± 0.2 ^{o}ซ ทำการเขย่าตลอดเวลาด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เมื่อครบ 2 ชั่วโมง ให้นำแกรนูลเคลือบที่ทดสอบออกและใส่ลงในจานแก้ว และแยกคัดเลือกเอาเฉพาะแกรนูลที่ยังอยู่ใน

สภาพสมบูรณ์โดยดูว่ายังมีแป้งอยู่ภายในโดยตรวจสอบด้วยตาเปล่าและมีการทดสอบการรั่วออกของแป้งและการถูกทำลายพื้นผิวของสารเคลือบโดยการนำแกรนูลที่เคลือบด้วยเพคตินไปแช่ในน้ำกลั่น ถ้ามีการทำลายจนถึงผิวแกรนูลที่ถูกเคลือบไว้แล้วจะสังเกตเห็นว่ามีผงแป้งรั่วออกมาจากรูพื้นผิวบริเวณนั้นจะถือเสมือนว่าเพคตินที่เคลือบไว้ถูกทำลายแล้ว ก็จะทำการคัดแยกแกรนูลเคลือบเพคตินเม็ดนั้นออกไป สำหรับสารละลายในสภาวะกรดหลังจากผ่านการทดสอบ 2 ชั่วโมง ให้แยกเศษเจลเล็ก ๆ ของเพคตินที่หลุดออกทิ้งไป นำสารละลายส่วนที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนแป้งที่รั่วออกมา เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง และถ้าพบว่ายังมีเจลของเพคตินลอยตัวคลุมอยู่ด้านบนเหนือตะกอนแป้งให้ใช้ปิเปตขนาด 20 μL ดูดเจลเพคตินทิ้ง แล้วล้างตะกอนแป้งด้วยน้ำกลั่น 5 ml อีก 2 ครั้งและแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกัน เพื่อให้แน่ใจว่าได้ตะกอนแป้งที่ไม่มีการปนเปื้อน นำตะกอนแป้งที่ล้างจนสะอาดแล้วผสมน้ำกลั่น 1 ml แล้วเขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนลงไปและดูปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของแป้งและอีกส่วนหนึ่งนำไปส่องดูโครงสร้างและการกระจายตัวของเม็ดแป้งภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำแกรนูลแป้งที่ทนต่อสภาวะกรดไปทำการทดสอบต่อไปใน phosphate buffer solution (PBS, pH 6.8) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาพเหมือนที่ลำไส้เล็ก และนำแกรนูลแป้งที่ผ่านการทดสอบในสภาวะนี้ไปทำการทดสอบต่อไปในสารละลายที่เสมือนน้ำย่อยที่ลำไส้ใหญ่ โดยใช้ PBS, pH 7.4 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ขั้นตอนในการตรวจวัดการรั่วออกของแกรนูลแป้งจากเพคตินใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบเมื่ออยู่ในสภาวะกรด

3. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของแกรนูลแป้งที่เคลือบด้วยเพคตินที่ผ่านการทดสอบ

คัดเลือกตัวอย่างแกรนูลเคลือบที่ผ่านการทดสอบในสภาวะกรด 0.1 N. HCl pH 1.2 และ PBS, pH 6.8 ไปศึกษาลักษณะพื้นผิวภายนอก (external surface) และแบบภาคตัดขวาง (cross section) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)